

Abordagem laparoscópica na égua como meio auxiliar nas técnicas de reprodução assistida

Laparoscopic approach of the mare as an aid in reproductive assisted technology

Sergio da Silva FIALHO¹; Giuliano Moraes FIGUEIRÓ¹;
Ricardo Coelho LEHMKÜHL¹; Marta PASIN¹; Mara Iolanda Batistella RUBIN²;
Carlos Antonio Mondino SILVA²

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Mara Iolanda Batistella Rubin
Departamento de Clínica de
Grandes Animais do Centro de
Ciências Rurais da Universidade
Federal de Santa Maria
97105-900 – Santa Maria – RS
e-mail: mrubin@lince.hcv.ufsm.br

1- Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária da UFSM – RS
2- Laboratório de Embriologia e
Reprodução Animal da UFSM – RS

RESUMO

A laparoscopia é uma ferramenta pouco explorada nas técnicas assistidas da reprodução em eqüinos, ao contrário do que já ocorre com o homem, animais de zoológicos e domésticos. Este estudo objetivou verificar a possibilidade de oferecer bases para a canulação do oviduto e sua futura aplicação em programas de transferência de gametas e embriões nesta espécie. Foram realizadas 17 laparoscopias em 10 éguas mantidas em estação onde cada ovário foi abordado pelo flanco ipsolateral. Após identificação da tuba uterina, o *infundibulum* foi gentilmente tracionado e um cateter avançado em direção ao óstio abdominal da tuba uterina para a ampola, onde foram depositados 250 µl de meio de cultivo (Dulbecco's - PBS). A utilização da técnica laparoscópica em reprodução assistida na égua pode ser considerada pioneira e tem o potencial de diminuir os custos de manutenção de receptoras através do aproveitamento de ciclos repetidos, o que não é possível pela abordagem convencional através de laparotomia. Este custo é um dos principais entraves à aplicação comercial das técnicas assistidas da reprodução em eqüinos.

UNITERMOS: Laparoscopia; Éguas; Reprodução.

INTRODUÇÃO

Dez anos antes da introdução da ultra-sonografia transretal em reprodução eqüina¹⁴, a laparoscopia permitiu que se confirmasse o sítio e se determinasse o horário da ovulação na égua^{24,25}. Outras aplicações da laparoscopia na reprodução assistida em eqüinos referem-se ao teste de patência das tubas uterinas⁷ e à inseminação no oviduto¹¹. Encontram-se descritos na égua procedimentos de ligadura tubária em cirurgia ginecológica¹¹ e ovariectomia^{2,10,15,16,18}.

A laparotomia de flanco em eqüinos continua sendo a abordagem de eleição para a transferência cirúrgica de embrião²¹, transferência intrafalopiana de gametas^{13,17} e, mais recentemente, para inseminação no oviduto^{12,19}. Já em outras espécies animais a laparoscopia vem sendo utilizada há mais tempo, obtendo-se, nas técnicas assistidas da reprodução, índices mais elevados de concepção quando comparados à laparotomia^{4,9,18}. A primeira prenhez obtida através da transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) em humanos só foi possível graças à abordagem translaparoscópica¹. Tendo em vista a questão ética envolvendo o bem-estar animal, aliada a um aproveitamento mais racional das éguas, técnicas de invasão mínima, como a laparoscopia, devem ser consideradas.

Com os recentes avanços das técnicas assistidas aplicadas na reprodução humana, o interesse no desenvolvimento de

outras técnicas no cavalo tem aumentado drasticamente. Proprietários e criadores não aceitam que uma égua não venha a produzir potros através dos métodos convencionais (incluindo a transferência de embriões) e cobram do veterinário outras alternativas. A transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) tem sido utilizada recentemente para produzir prenhez³.

Este trabalho tem o propósito de descrever o procedimento laparoscópico em éguas. Além disso, verificar sua eficiência e aplicação para avaliação dos órgãos genitais e seu uso como ferramenta para procedimentos em reprodução assistida.

MATERIAL E MÉTODO

Dez éguas (2 Brasileiras de Hipismo, 2 Crioulas e 6 sem raça definida), com idade variando entre 5 e 14 anos, foram utilizadas para a realização de 17 procedimentos laparoscópicos. Para tal, foram submetidas a um jejum alimentar e hídrico de 24 horas para diminuir o conteúdo intestinal e permitir maior visibilidade. A tricotomia da região dos flancos foi realizada do bordo caudal da última costela até a tuberosidade coxal e, ventralmente, até 30 cm dos processos transversos das vértebras lombares. A sedação foi obtida através da administração endovenosa de cloridrato de xilazina¹ (0,5 mg/kg) em combinação com tartarato de butorfanol² (0,05 mg/kg). A pele e a musculatura do flanco foram infiltradas com 40 a 60 ml de lidocaína

¹ Sedazine (Laboratório Fort Dodge).

² Torbugesic (Laboratório Fort Dodge).

sem vasoconstritor³ no padrão L-invertido. As éguas foram posicionadas em um brete de contenção e, após preparação para cirurgia asséptica, os panos de campo foram posicionados de forma a permitir acesso a ambos os flancos. O monitor de vídeo foi posicionado atrás do animal e o cirurgião e o assistente, posicionados, inicialmente, ao lado esquerdo do animal. Cada ovário foi abordado individualmente pelo lado ipsilateral, começando sempre pelo flanco esquerdo.

Fez-se uma incisão de 1 cm na pele e fáscia do músculo abdominal oblíquo externo sob o nível horizontal do aspecto ventral da tuberosidade coxal, no ponto médio entre o aspecto caudal da última costela e tuberosidade coxal. Uma cânula metálica (Ø: 3mm) foi introduzida através da incisão em direção à articulação fêmuro-tíbio-rotuliana contralateral até que o som de entrada de ar no abdômen confirmasse a sua penetração no espaço peritoneal. Neste momento, a cânula foi acoplada a um insuflador mecânico⁴ e o abdômen insuflado para manter uma pressão intra-abdominal de 12 a 15 mm de Hg.

Após distensão do abdômen, um conjunto primário trocarte com bainha⁵ era introduzido através de uma incisão de 7,5 mm, 5 a 10 cm crânio-dorsal à cânula de insuflação. O trocarte era removido, o manguito de insuflação acoplado à bainha, e um laparoscópio⁶ de 7 mm inserido por ela. O laparoscópio foi conectado a uma fonte de luz⁷ e videocâmera⁸. Após uma exploração inicial, a cânula de insuflação foi substituída por um conjunto trocarte-cânula acessório⁹. Um terceiro conjunto trocarte-cânula foi inserido 5 a 10 cm caudoventral à cânula de insuflação.

Após identificação do ovário, este foi fixado utilizando-se uma pinça atraumática¹⁰, sendo manipulado de maneira a expor as fimbrias e a fossa de ovulação. Uma cânula metálica com um cateter¹¹ em sua extremidade distal foi introduzida e posicionada no *infundibulum*. O cateter, previamente siliconizado com spray lubrificante¹², foi introduzido pelas fimbrias em direção ao interior da ampola do oviduto, onde eram depositados 250 µl de meio de cultivo (D-PBS = Dulbecco's solução salina fosfatada). Procedimento idêntico foi realizado no flanco direito. O que serviu como treinamento para cateterização do oviduto.

Ao término dos procedimentos, o pneumoperitônio foi interrompido, as bainhas removidas e as incisões suturadas com pontos em "X", utilizando fio mononáilon 2-0. Todas as éguas submetidas a laparoscopia foram retiradas imediatamente do jejum alimentar e hídrico após remissão dos efeitos da sedação. O curativo das feridas cirúrgicas foi realizado com água oxigenada, até a remoção dos pontos no sétimo dia pós-operatório. Os animais foram mantidos em observação até a retirada dos pontos. Neste período, foram registrados o tempo para fechamento da ferida, a temperatura corporal e as frequências cardíaca e respiratória.

RESULTADOS

Não foram observados sinais de desconforto abdominal nos animais após os procedimentos. A técnica de medicação anestésica empregada revelou-se eficiente, permitindo a realização segura do procedimento laparoscópico.

As complicações que ocorreram durante os procedimentos foram a formação de hematoma de parede muscular (n=2) e enfisema subcutâneo (n=4). A temperatura retal dos animais foi medida diariamente, não sendo verificada qualquer alteração. O enfisema subcutâneo que ocorreu após a realização de dois procedimentos foi de grau leve e regrediu em, no máximo, três dias. Da mesma forma, os hematomas de parede abdominal, provocados no momento da inserção do trocarte, regrediram rapidamente. Todas as 10 éguas apresentaram evolução cicatricial satisfatória das incisões executadas para a realização dos 17 procedimentos.

O jejum prévio de 24 horas foi suficiente para obter-se uma visualização adequada do trato reprodutivo das éguas. No flanco esquerdo houve nítida visualização da borda caudal do baço, partes do intestino delgado, mesentério do intestino delgado, cólon maior, cólon menor, ovário esquerdo, útero, bexiga e reto. No flanco direito observou-se a base do ceco, duodeno descendente, partes do intestino delgado, cólon maior, reto, ovário direito e útero, reconhecidos por suas características morfológicas macroscópicas.

O tempo mínimo utilizado desde a introdução da ótica até o término do procedimento laparoscópico foi de 45 minutos. O tempo médio do exame foi de aproximadamente 60 minutos. Em duas éguas, até três procedimentos laparoscópicos foram realizados em intervalos não maiores que 23 dias. O fluxo de gás carbônico durante a insuflação abdominal foi em média de 4 litros/minuto e, dependendo do tamanho da égua, 30 a 40 litros de CO₂ foram necessários para se alcançar uma pressão intra-abdominal de 12 mm de Hg. Foram gastos, em média, 80 litros de CO₂ por procedimento. A média de consumo de CO₂, não incluindo o volume da insuflação inicial, foi de 40 l/hora.

Foram realizadas 17 laparoscopias e um total de 27 canulações do oviduto. A simulação de transferência de gametas através da laparoscopia foi obtida através de uma abordagem envolvendo dois portais para instrumentos acessórios e um para a ótica. A tuba uterina foi identificada e cuidadosamente alongada de maneira que o óstio e a ampola fossem alinhados com o cateter. O cateter foi avançado em direção ao interior da ampola através da punção abdominal ventral, e os 250 µl de D-PBS depositados no interior da tuba. O mesmo procedimento foi realizado na tuba contralateral. Quando houve dificuldade na canulação, o procedimento foi interrompido para minimizar danos ao oviduto bem como exposição prolongada do peritônio ao CO₂. Nesses casos, o D-PBS era depositado sobre o óstio abdominal da tuba.

³ Lidocaina Geyer 2% (Geyer Medicamentos S.A.).

⁴ Insuflador mecânico, modelo IS-10 (H. Strattner & Cia. Ltda.).

⁵ Bainha tipo janela p/trocarte, Ø7.5mm, c/válvula de CO₂ (EDLO).

⁶ Endoscópio rígido Hopkins, Ø7mm, cód.: 26031B (Karl Storz - Germany).

⁷ Endolux 150W (H. Strattner & Cia. Ltda.).

⁸ Edwards Camera System, modelo AR6500 (Baxter - U.S.A.).

⁹ Bainha tipo janela p/ trocarte, Ø10mm, c/válvula de CO₂ (EDLO).

¹⁰ Pinça atraumática Babcock, giratória Ø10mm, com vídea (EDLO).

¹¹ Sovereign 3¼Tom Cat™ Catheter (Sherwood Medical - U.S.A.).

DISCUSSÃO

Há poucos relatos contendo a descrição anatômica e aplicações da laparoscopia em eqüinos⁶. Uma descrição detalhada e completa da anatomia laparoscópica do eqüino, para fins de exploração diagnóstica, foi feita recentemente por Galuppo et al.⁸.

Laparoscópios com um diâmetro externo de 10 mm e fontes de luz com potência de 300 W são utilizados para a maioria dos procedimentos em animais de grande porte¹¹. Neste trabalho, tendo em vista o aproveitamento do material disponível e custos relacionados à aquisição de novos equipamentos, optou-se pela utilização de uma ótica com diâmetro externo de 7 mm e uma fonte de luz com 150 W de potência. Portanto, imagens claras só foram obtidas quando do posicionamento próximo ao objeto a ser examinado, o que foi um fator limitante ao desenvolvimento da técnica.

Para completar o procedimento, a administração da xilazina foi repetida conforme necessário. Foi observada reação dolorosa associada provavelmente à entrada de ar frio sob pressão diretamente no ovário bem como sua tração e manipulação. A prevenção deste tipo de reação pode vir a ser feita através da utilização de insufladores com controle de temperatura, anestesia epidural¹¹, bloqueio anestésico do pedículo ovariano² ou infiltração anestésica do ligamento largo do útero¹⁵.

A experiência prática foi essencial para a identificação rápida e para o exame dos ovários. A abordagem utilizada na canulação do oviduto foi determinada através de simulações prévias em caixa-preta com peças de abatedouro. Em 16 dos 17 procedimentos, em que houve uma exposição adequada da extremidade tubárica, os 250 µl de PBS foram depositados sobre o óstio abdominal da tuba. A canulação do oviduto ofereceu extrema dificuldade técnica, tendo em vista a disposição anatômica das tubas uterinas na égua e não apresentou repetibilidade, provavelmente devido à pouca flexibilidade do cateter utilizado. O ponto ideal para deposição do PBS para garantir que não haveria refluxo seria 2-3 cm para o interior da ampola do oviduto¹². O avanço do cateter para o interior da tuba uterina foi interrompido no momento em que foi encontrada resistência, aproximadamente 1 cm após penetrar na ampola.

A maioria dos instrumentos existentes no mercado foram desenvolvidos para utilização em pacientes em decúbito dorsal e, portanto, não beneficiam as abordagens de flanco com animal em estação. Atualmente estão sendo introduzidos no mercado instrumentos específicos, articuláveis (45-90°) que permitirão um direcionamento mais facilitado para o interior do oviduto.

Em duas éguas foram realizados até três procedimentos com intervalos não superiores a 23 dias, o que corrobora a afirmação de Wildt et al.²² de que a laparoscopia permite exames repetidos com sobrecarga orgânica mínima ou trauma cirúrgico reduzido ao animal. Wishart et al.²³ não observaram efeitos negativos na fertilidade subsequente em vacas submetidas a laparoscopia por diversos exames repetidos, embora Fischer et al.⁶ descrevam au-

mento na contagem de células brancas e fibrinogênio em cavalos, características de peritonite.

A laparoscopia é uma ferramenta auxiliar que pode vir, como ocorre em outras espécies, a colaborar para o incremento dos índices de concepção^{4,9,18}, oferecendo alternativas para os casos de infertilidade em humanos e para a manutenção da diversidade genética em animais de zoológico, onde se concentram hoje os maiores investimentos em pesquisa. Nestas espécies, a laparoscopia, para fins de reprodução assistida, é uma técnica muito bem desenvolvida e estabelecida; vem se testando, ultimamente, a substituição desta técnica por procedimentos menos invasivos, como é o caso da microlaparoscopia⁵, histeroscopia²⁰ e, mais recentemente, procedimentos guiados por ultrassonografia²⁶.

Devido ao tempo necessário à cicatrização das incisões, a abordagem convencional utilizada atualmente não pode ser realizada mais do que uma vez durante uma temporada, o que se reflete em custos altíssimos na manutenção de éguas receptoras¹¹. A transferência intrafalopiana de gametas e a transferência de embriões através de laparoscopia representam um desafio técnico que pode vir a constituir uma ferramenta confiável para tentativas repetidas de fecundação. A abordagem laparoscópica minimiza as complicações associadas a laparotomia de flanco, como a deiscência de suturas, ruptura de baço e ceco durante a introdução da mão no flanco através do peritônio²¹.

A técnica laparoscópica de canulação do oviduto encontra-se ainda em estágio de desenvolvimento, tendo somente uma breve descrição em livro-texto feita por Hendrickson¹¹. A transferência intrafalopiana de gametas (GIFT), inseminação ovidutal (IO) e transferência de zigotos (ZIFT) são benefícios importantes que podem ser obtidos com o desenvolvimento de uma técnica confiável. Outra aplicação da laparoscopia na reprodução assistida em eqüinos seria a transferência cirúrgica de embriões através da abordagem transmiometrial.

CONCLUSÕES

As tentativas de canulação do oviduto descritas neste trabalho permitiram adquirir a experiência e a segurança necessárias para o acesso rápido e seguro através da laparoscopia visando a manipulação do trato genital das éguas. Concluiu-se que:

- O método laparoscópico é um procedimento eficiente para a visualização direta dos órgãos da cavidade pélvica em éguas;
- A abordagem laparoscópica de flanco nas éguas em estação, com vistas à canulação do oviduto, é um procedimento pouco agressivo, rápido e bem tolerado pelas éguas;
- A laparoscopia é um procedimento invasivo muito bem tolerado que poderá vir a ser uma ferramenta valiosa para aplicação nas técnicas assistidas da reprodução eqüina por promover excelente observação dos órgãos pélvico-abdominais nos aspectos dorsais do abdômen da égua em estação.

¹² SILKOSPRAY. Universal silicone spray. (Willy Rüsich - Germany).

SUMMARY

Laparoscopy is a poorly explored tool for equine assisted reproduction techniques, despite its use in man, zoo and domestic animals. This study had the objective to evaluate the possibility and offer basis for cannulation of the oviduct and its future application in gamete and embryo transfer programs in this species. Seventeen standing laparoscopies were accomplished in ten mares, each ovary approached from its ipsilateral flank. After identification of the uterine tube, the *infundibulum* was gently tractioned and a catheter advanced in direction of the abdominal ostium of the uterine tube to the ampulla where 250 µL of culture medium (Dulbecco's - PBS) were deposited. The laparoscopic technique associated with assisted reproduction in the mare can be considered pioneer and have the potential of lowering costs with maintenance of receptors by taking advantage of repetitive cycles, which is impossible by means of the conventional approach through laparotomy. This cost is one of the main obstacles for the commercial application of assisted reproduction techniques in horses.

UNITERMS: Laparoscopy; Mares; Reproduction.

REFERÊNCIAS

- 1- ASCH, R. H.; et al. Pregnancy after translaparoscopic gamete intrafallopian transfer. **The Lancet**, n. 3, p. 1034-1035, 1984.
- 2- BOURÉ, L.; MARCOUX, M.; LAVERTY, S. Paralumbar fossa laparoscopic ovariectomy in horses with use of endoloop ligatures. **Veterinary Surgery**, v. 26, p. 478-483, 1997.
- 3- CARNEVALE, E. M. Gamete intrafallopian transfer. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 12, p. 47-60, 1996.
- 4- DIDION, B. A. Laparoscopic artificial insemination in pigs. **Theriogenology**, v. 37, n. 1, 1992.
- 5- DOWNING, B. G.; WOOD, C. Initial experience with a new microlaparoscope 2mm in external diameter. **Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 35, n. 2, p. 202-204, 1995.
- 6- FISCHER, A. T. et al. Diagnostic laparoscopy in the horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 3, p. 289-292, 1986.
- 7- FISCHER, A. T. Standing laparoscopic surgery. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 7, p. 485-735, 1991.
- 8- GALUPPO, L. D.; SNYDER, J. R.; PASCOE, J. R. Laparoscopic anatomy of the equine abdomen. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 4, p. 518-531, 1995.
- 9- KILLEN, I. D.; CAFFERY, G. J. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. **Australian Veterinary Journal**, v. 59, p. 95, 1982.
- 10- HANSON, C. A.; GALUPPO, L. D. Bilateral laparoscopic ovariectomy in standing mares. **Am. Assoc. Equine Pract., Proceedings**, v. 44, p. 300-301, 1998.
- 11- HENDRICKSON, D. A. Minimally invasive surgery of the reproductive system in large animals. In: FREEMAN, L. J. **Veterinary endoscopy**. Saint Louis: Mosby, 1998. cap. 11, p. 217-225.
- 12- McCUE, P. M.; FLEURY, J. J.; DENNISTON, D. J. Oviductal insemination in the mare. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION, 7., 1998. Pretória, África do Sul. **Anais...** Pretória, 1998, p. 133-134.
- 13- MCKINNON, A. O. et al. Heterogenous and xenogenous fertilization of in vivo matured equine oocytes. **Equine Nutrition and Physiology Society**, v. 8, n. 2, p. 143-147, 1988.
- 14- PALMER, E.; DRIANCOURT, M. S. Use of ultrasound echography in equine gynecology. **Theriogenology**, v. 13, p. 203-216, 1980.
- 15- PALMER, S. E. Standing laparoscopic laser technique for ovariectomy in five mares. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 203, n. 2, p. 279-283, 1993.
- 16- RAGLE, C. A.; SCHNEIDER, R. K. Ventral abdominal approach for laparoscopic ovariectomy in horses. **Veterinary Surgery**, v. 24, p. 492-497, 1995.
- 17- RAY, B. S. et al. Pregnancy following gamete intrafallopian transfer in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 14, n. 1, p. 27-30, 1994.
- 18- SCHIEWE, M. C. et al. Laparoscopic embryo transfer in domestic sheep: a preliminary study. **Theriogenology**, v. 22, n. 6, p. 675-682, 1984.
- 19- SCHMID, R. L. et al. Fertilization with sexed equine spermatozoa using intracytoplasmic sperm injection and oviductal insemination. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION, 7., 1998. Pretória, África do Sul. **Anais...** Pretória, 1998. p. 139-140.
- 20- SERACCHIOLI, R. et al. Gamete intrafallopian transfer: prospective randomized comparison between hysteroscopic and laparoscopic transfer techniques. **Fertility & Sterility**, v. 64, n. 2, p. 355-359, 1995.
- 21- SQUIRES, E. L. et al. **Collection and transfer of equine embryos**. Colorado: Colorado State University Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory. Boletim n. 8, 1995, 64 p. (Boletim, n.8)
- 22- WILDT, D. E. et al. Laparoscopy: a method for direct examination of internal organs in zoo veterinary medicine and research. **Husbandry**, p. 194-197, 1977.
- 23- WISHART, D. F.; SNOWBALL, J. B. Endoscopy in cattle: observation of the ovary in situ. **The Veterinary Record**, v. 92, p. 139-143, 1973.
- 24- WITHERSPOON, D. M.; TALBOT, R. B. Ovulation site in the mare. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 157, n. 11, p. 1452-1459, 1970.
- 25- WITHERSPOON, D. M.; TALBOT, R. B. Nocturnal ovulation in the equine animal. **The Veterinary Record**, p. 302-304, 1970.
- 26- WOOD, E. G.; BATZER, F. R.; GO, K. J. et al. Ultrasound-guided soft catheter embryo transfers will improve pregnancy rates in in vitro fertilization. **Human Reproduction**, v. 15, n. 1, p. 107-112, 2000.

Recebido para publicação: 25/08/2000
Aprovado para publicação: 31/01/2002